

PCT/IB 05 / 00 305
(03.03.05)
02

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2004 A 000251** ✓

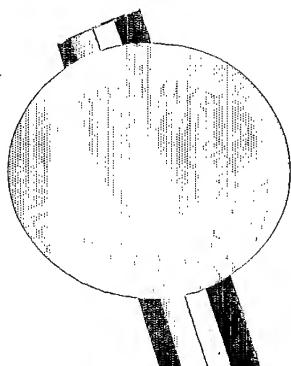


Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

25 FEB. 2005

Roma, li.....

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotto

Giampietro Carlotto

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°

MI 2004 A 0 0 0 2 5 1

A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2 PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3	02133971008
INDIRIZZO COMPLETO	A4	Via Orazio Raimondo 18 - 00173 ROMA RM		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	ISTITUTI FISIOTERAPICI OSPITALIERI		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2 PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3	01033011006
INDIRIZZO COMPLETO	A4	Via Elio Chianesi 53 - 00128 ROMA RM		
B.RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO	BO	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP/LOCALITA'/PROVINCIA	B3			
C. TITOLO	C1	Anticorpo policlonale anti-UBE4A/Ufd2b e relativo impiego come marcatore diagnostico e prognostico delle alterazioni della regione 11q23		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	NOVELLI Giuseppe
NAZIONALITA'	D2	italiana
COGNOME E NOME	D1	SPAGNOLI Luigi Giusto
NAZIONALITA'	D2	italiana
COGNOME E NOME	D1	PUCCI Sabina
NAZIONALITA'	D2	italiana
COGNOME E NOME	D1	CONTINO Gianmarco
NAZIONALITA'	D2	italiana

E. CLASSE PROPOSTA

SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E1	E2	E3	E4	E5

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1	Tipo	F2
NUMERO DOMANDA	F3	DATA DEPOSITO	F4
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1	Tipo	F2
NUMERO DOMANDA	F3	DATA DEPOSITO	F4
G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI	G1		
FIRMA DEL/ DEI RICHIEDENTE/I	p.i. di UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA" ISTITUTI FISIOTERAPICI OSPITALIERI Albo N. 938 B Dr. MARGUTTI Roberto <i>Roberto Margutti</i>		

MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI, CONSAPEVOLE/I DELLE SANZIONI PREVISTE DALL'ART.76 DEL D.P.R. 28/12/2000 N.445.

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME	I1	Albo N. 938 B Dr. MARGUTTI Roberto, ed altri
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	Bugnion SpA
INDIRIZZO	I3	Viale Lancetti, 17
CAP/LOCALITA'/PROVINCIA	I4	20158 Milano
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	La titolarità e proprietà del brevetto è registrata: 80% UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA" e 20% ISTITUTI FISIOTERAPICI OSPITALIERI per accordi esistenti tra le parti. Lettera di incarico con riserva

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

Tipo DOCUMENTO	N. ES. ALL.	N. ES. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ, RIVENDICAZ.	1		17
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE)	1		2
DESIGNAZIONE D'INVENTORE	0	1	
DOCUMENTI DI PRIORITA' CON TRADUZIONE IN ITALIANO	0		
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE	0		
	(SI/NO)		
LETTERA D'INCARICO	NO		
PROCURA GENERALE	NO		
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE	NO		

IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE

ATTESTATI DI VERSAMENTO	Euro	CentoOttantotto/51
Foglio AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI) DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)	A	D X F
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO? (SI/NO)	SI	
	NO	
DATA DI COMPILAZIONE	16 feb 2004	

FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I

p.i. di UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA", ISTITUTI FISIOTERAPICI OSPITALIERI
Albo N. 938 B Dr. MARGUTTI Roberto

Roberto Margutti

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	MI 2004 A0 00251 ✓	
C.C.I.A.A. DI	Milano	Cod. 15
IN DATA	16 feb 2004 ✓	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO
LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N.	01	FOGLI AGGIUNTIVI, PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPORTATO.
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE		
IL DEPOSITANTE	L'UFFICIALE ROGANTE	
<i>Roberto Margutti</i>	<i>CORTONESI MAURIZIO</i>	



FOGLIO AGGIUNTIVO MODULO A

MI 2004 A 0 0 0 2 5 1

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°

FOGLIO AGGIUNTIVO N. 1

DI TOTALI: 1

A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3	
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3	
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3	
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3	
INDIRIZZO COMPLETO	A4			

D. INVENTORE / I DESIGNATO/I

COGNOME E NOME	D1	CITRO Gennaro
NAZIONALITA'	D2	italiana
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO o ORGANIZZAZIONE	F1		Tipo	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO o ORGANIZZAZIONE	F1		Tipo	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO o ORGANIZZAZIONE	F1		Tipo	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	

FIRMA DEL / DEI
RICHIEDENTE / I
 c. i. di UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA", ISTITUTI
 FISIOTERAPICI OSPITALIERI
 Albo N. 938 B Dr. MARGUTTI Roberto

Roberto Margutti

PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA:

MI 2004 A 0 0 0 2 5 1

DATA DI DEPOSITO:

16 FEB. 2004

A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO:

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA" ROMA RM - ISTITUTI FISIOTERAPICI OSPITALIERI
ROMA RM

C. TITOLO

Anticorpo policlonale anti-UBE4A/Ufd2b e relativo impiego come marcatore diagnostico e prognostico delle alterazioni della regione 11q23

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

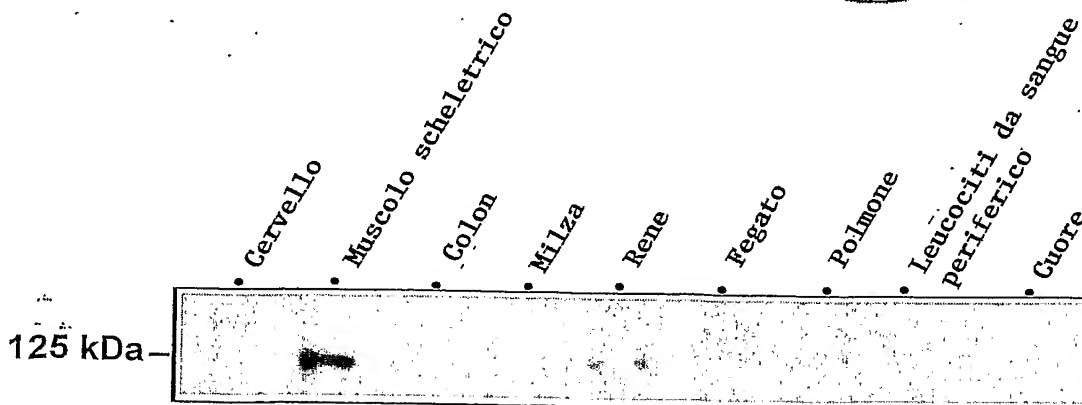
SOTTOGRUPPO

E. CLASSE PROPOSTA

O. RIASSUNTO

La presente invenzione ha per oggetto un anticorpo policlonale anti-UBE4A/Ufd2b. Inoltre, la presente invenzione si riferisce all'impiego di detto anticorpo come marcatore diagnostico e prognostico delle alterazioni della regione 11q23.

F. DISEGNO PRINCIPALE

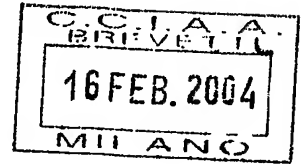


FIRMA DEL/DEI
RICHIEDENTE/I

p.i. di UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA", ISTITUTI
FISIOTERAPICI OSPITALIERI
Albo N. 938 B Dr: MARGUTTI Roberto

Roberto Margutti

Dott. Roberto Margutti
Albo n. 938B



DESCRIZIONE

Annessa a domanda di brevetto per INVENZIONE INDUSTRIALE avente per titolo

“Anticorpo policlonale anti-UBE4A/Ufd2b e relativo impiego come marcatore diagnostico e prognostico delle alterazioni della regione 11q23 ”

A nome: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA “TOR VERGATA”
con sede a Roma (titolare all'80%) e ISTITUTI FISIOTERAPICI
OSPITALIERI con sede a Roma (titolare al 20%)

Mandatari: Ing. Giuseppe Righetti iscritto all'Albo con il n. 7BM, Ing. Carlo
Raoul Ghioni iscritto all'Albo con il n. 280 BM, Ing. Martino
Salvadori iscritto all'Albo con il n. 438 BM, Fabrizio Tansini
iscritto all'Albo con il n. 697 BM, Dott. Roberto Margutti iscritto
all'Albo al n. 938B Ing. Gianmarco Ponzellini iscritto all'Albo al
n. 901BM, Ing. Luigi Tarabbia iscritto all'Albo al n. 10'05B della
BUGNION S.p.A. domiciliati presso quest'ultima in MILANO -
Viale Lancetti 17.

Depositato il: al n.: **MI 2004 A 0 0 0 2 5 1**

La presente invenzione ha per oggetto un anticorpo policlonale anti-
UBE4A/Ufd2b. Inoltre, la presente invenzione si riferisce all'impiego di detto
anticorpo come marcatore diagnostico e prognostico delle alterazioni della
regione 11q23.

Sono noti la natura e la funzione degli anticorpi.

In generale gli anticorpi, detti anche immunoglobuline (Ig), sono proteine
prodotte dai Vertebrati in risposta alla presenza nel corpo di un antigene ovvero

di molecole estranee, organismi o altri agenti. Gli anticorpi sono prodotti prevalentemente dalle plasmacellule (differenziamento terminale dei linfociti-B) e circolano nei vasi sanguigni e linfatici dove incontrano e si legano agli antigeni.

5 Un antigene è quindi una sostanza che, se introdotta in un organismo, è capace di indurre una risposta immunitaria ed è in grado di combinarsi con anticorpi e recettori cellulari.

Le caratteristiche di un antigene sono due: la immunogenicità, cioè la proprietà di indurre una risposta immunitaria umorale (gli anticorpi) o cellulare e
10 l'antigenicità, cioè la capacità di reagire in modo selettivo con anticorpi specifici. La porzione dell'antigene che rappresenta il sito di legame con l'anticorpo è chiamato epitopo. Gli anticorpi hanno la capacità di combinarsi chimicamente, in modo altamente specifico, con la molecola dell'antigene che ne ha indotto la produzione (epitopo), per formare un complesso antigene-
15 anticorpo che comporta l'inattivazione dell'antigene stesso o la rimozione attraverso la fagocitosi dei macrofagi.

Da un punto di vista biologico la risposta anticorpale rappresenta uno dei meccanismi principali che un organismo ha a disposizione per difendersi dall'azione di molecole estranee e organismi patogeni.

20 E' noto anche che, nella ricerca e la diagnostica biomediche come nella pratica clinica, gli anticorpi possano essere prodotti con varie metodiche e utilizzati come reagenti capaci di legare uno specifico antigene. Essi trovano comunemente utilizzo, ad esempio, per determinare la precisa localizzazione sub-cellulare di un antigene o isolarlo da un complesso di molecole, verificare
25 con quali altre macromolecole interagisca, determinarne l'esatta concentrazione

o porre diagnosi specifica di una neoplasia. Proprio a scopo diagnostico, infatti, i più comuni metodi basati su reazioni chimico-enzimatiche, sono ora soppiantati dall'uso di anticorpi che permettono di visualizzare su sezioni di tessuto poste su un vetrino la presenza a livello qualitativo e quantitativo di un determinato antigene attraverso una tecnica nota chiamata immunoistochimica. Cio' permette di poter ottenere rapidamente informazioni che rispecchiano fedelmente le alterazioni discariocinetiche (a carico dei cromosomi) e del DNA specifiche della neoplasia, ovvero le alterazioni che la cellula tumorale ha subito a livello cromosomico e che hanno come epifenomeno la variazione nell'espressione di alcuni antigeni. Alcune regioni cromosomiche sono più frequentemente soggette a traslocazioni, delezioni, amplificazioni etc. Sono note, ad esempio, le alterazioni della regione 11q23 che sono specifiche per certi tipi di tumore ad alta incidenza come il Neuroblastoma, la Leucemia Acuta Linfoide e la Leucemia Acuta Mieloide. Inoltre l'affinamento delle tecniche permetterà di identificare altri tumori con alterazioni di questa regione. Sebbene di alcune neoplasie sia possibile ottenere la diagnosi con il solo esame istologico (ovvero l'analisi al microscopio ottico del tessuto), la possibilità di ottenere informazioni aggiuntive sulle alterazioni molecolari (DNA) di un tumore presenta un vantaggio irrinunciabile: poter stratificare il gruppo di pazienti affetti da una stessa neoplasia in sottogruppi prognosi differenti e quindi indirizzarli verso protocolli terapeutici più adeguati. Inoltre risultati incoraggianti mostrano come la stessa alterazione molecolare può spesso rappresentare il target di una terapia mirata, permettendo in un futuro prossimo una rivoluzione radicale nella terapia farmacologia del cancro.

Quindi, sarebbe auspicabile poter disporre di uno specifico anticorpo in grado di

poter reagire selettivamente con uno specifico antigene per diagnosticare alterazioni molecolari che, ad esempio, nei tumori che interessano la regione 11q23 ci permettano di comprendere la biologia del tumore, definire la prognosi e darci indicazioni terapeutiche.

5 Nella pratica biomedica il target più frequente della produzione di anticorpi degli antigeni prodotti sono le proteine che rappresentano il substrato strutturale e funzionale di tutti i processi biologici.

Una proteina è rappresentata, nella sua struttura primaria, da una sequenza di amminoacidi. Gli amminoacidi vengono assemblati in un ordine specifico,
10 codificato dal gene corrispondente presente nel DNA della cellula.

La complessità delle strutture e dei processi biologici che devono essere svolte dalla cellula richiedono un numero incredibilmente alto di proteine diverse. In uno stesso organismo tutte le cellule somatiche contengono le stesse informazioni a livello del DNA e sono quindi in teoria in grado di assemblare
15 tutte le proteine. Tuttavia, queste stesse cellule esprimono in maniera differenziale le varie proteine, attraverso complessi sistemi di regolazione, a seconda del tessuto di cui fanno parte e della funzione specifica che svolgono (ad es. un neurone e una cellula muscolare). In primo luogo rimane quindi la
necessità di avere uno strumento per caratterizzare i pattern di espressione

20 tessuto-specifici delle varie proteine. Per confronto alterazioni di questi pattern di espressione potranno essere rinvenuti in tessuti patologici. Identificare selettivamente una proteina significa poterne indagare le interazioni con altre proteine o macromolecole. La comprensione di queste interazioni è un passaggio essenziale per comprendere la biologia della cellula e la complessità delle sue
25 funzioni. Una cellula deve infatti rispondere in modo dinamico alle



modificazioni del microambiente modulando i livelli di espressione delle singole proteine e degradandole quando la loro funzione non è più necessaria. Si pensi ad esempio ai fattori di controllo del ciclo cellulare, alle proteine responsabili della sintesi proteica stessa, ai sistemi di riparo del DNA e al sistema delle
5 Chaperonine e delle Heat Shock Protein che guidano le proteine nel riacquisire la loro struttura originaria in seguito ad eventi stressogeni. Particolare interesse desta a questo riguardo lo studio del pathway dell'ubiquitinazione. L'ubiquitinazione è un processo cellulare fondamentale noto che consiste nel legare una proteina chiamata ubiquitina ad una proteina che dev'essere
10 degradata. L'ubiquitina rappresenta il segnale di degradazione per il proteosoma 26S (proteasi ATP-dipendente) il quale è responsabile della degradazione di proteine i cui livelli sono regolati in risposta a modificazioni nell'ambiente cellulare. Questo meccanismo garantisce un turn-over delle proteine essenziale per la sopravvivenza della cellula e media la degradazione di proteine
15 responsabili di attività come la progressione al ciclo cellulare, la risposta allo stress, la processazione degli antigeni, il signaling cellulare, la riparazione del DNA, la morte programmata. Non stupisce che alterazioni di questo pathway siano state a vario titolo implicate in malattie neurodegenerative (come l'Alzheimer e il Parkinson), d'accumulo e in eventi neoplastici in cui la cellula
20 acquista una crescita autonoma perdendo il controllo sul ciclo cellulare e senza poter innescare il meccanismo della morte programmata.

Pertanto, rimane la necessità di poter disporre di uno specifico anticorpo, selettivo per uno specifico antigene, in grado di diagnosticare le alterazioni molecolari che interessano la regione cromosomica 11q23 permettendo di

comprendere la biologia del tumore, definire la prognosi e dare indicazioni terapeutiche.

Un primo scopo della presente invenzione è quello di mettere a disposizione un anticorpo in grado di evidenziare la presenza a livello qualitativo e quantitativo
5 di un determinato antigene attraverso la tecnica immunoistochimica.

Un altro scopo della presente invenzione è quello di fornire un metodo diagnostico e prognostico per determinare le alterazioni che la cellula tumorale ha subito a livello cromosomico nella regione 11q23.

Ulteriore scopo della presente invenzione è quello di mettere a disposizione un
10 anticorpo in grado di reagire selettivamente con uno specifico antigene per diagnosticare le alterazioni molecolari nei tumori che coinvolgono la regione 11q23 come nel caso del Neuroblastoma, Leucemia Acuta Linfoide e Leucemia Acuta Mieloide.

Un altro scopo ancora è quello di fornire un anticorpo policlonale in grado di
15 riconoscere selettivamente una proteina coinvolta nel pathway dell'ubiquitinazione.

Forma oggetto della presente invenzione un anticorpo avente le caratteristiche come riportato nella unita rivendicazione principale.

Forma un altro oggetto della presente invenzione l'impegno di detto anticorpo nel
20 campo della ricerca, della diagnostica e in medicina secondo le indicazioni riportate nelle unite rivendicazioni principali.

Forma un ulteriore oggetto della presente invenzione un kit diagnostico e prognostico come marcatore di alterazioni molecolari tumorali aventi le caratteristiche come riportato nella unita rivendicazione.

La Richiedente ha condotto studi di ricerca diretti a sviluppare e produrre un anticorpo specifico per l'antigene costituito dalla proteina umana e murina UBE4A/Ufd2b.

La Richiedente ha focalizzato i suoi studi sulla proteina umana e murina UBE4A in quanto la regione del genoma dove UBE4A è situata (cromosoma 11q23) risulta essere deleta in alcune forme tumorali.

UBE4A è una proteina che partecipa al processo di Ubiquitinazione.

In particolare UBE4A/Ufd2b è una "E3 ligasi". Le E3 ligasi fanno parte di una numerosa famiglia di proteine che, nell'ambito del processo di ubiquitinazione, è responsabile della selezione specifica della proteina da degradare. È noto che alterazioni di una di queste proteine risultino nell'accumulo o nella eccessiva funzione di proteine che dovrebbero essere degradate, con conseguente danno cellulare, d'organo o sistemico. Inoltre UBE4A/Ufd2b può agire anche come fattore di poliubiquitinazione ovvero allunga la catena di ubiquitine legate alla proteina da degradare aumentando l'efficienza della degradazione. Il dominio funzionale della proteina UBE4A/Ufd2b è chiamato U-box ed è rappresentato da una porzione di circa 64 aa localizzato nella parte C-terminale della proteina. Questo dominio è altamente conservato nell'evoluzione e, in altri organismi, sono state dimostrate interazioni con proteine coinvolte nella progressione del ciclo cellulare e nell'assemblaggio sia a livello dell'mRNA sia nel folding delle proteine.

La Richiedente per produrre l'anticorpo specifico per l'antigene costituito dalla proteina UBE4A/Ufd2b ha impiegato la tecnica nota dell'immunizzazione. In pratica, l'immunizzazione è una tecnica nota per la produzione di un anticorpo in grado di legare una specifica proteina.

L'immunizzazione consiste nell'immunogenizzare un coniglio o altro animale con uno specifico epitopo caratteristico della proteina target. Differenti cloni di plasmacellule produrranno anticorpi capaci di riconoscere l'epitopo selezionato. Questi anticorpi saranno presenti in grande numero nel siero dell'animale che
5 quindi rappresenta una buona fonte di anticorpi policlonali.

L'epitopo è rappresentato da una porzione della proteina, quindi da una sequenza di amminoacidi avente una lunghezza compresa da (10 a 25 amminoacidi (aa)).

La Richiedente ha analizzato la sequenza amminoacidica della proteina
10 UBE4A/Ufd2b umana (Homo Sapiens) e ha confrontato detta sequenza con quella del topo (mus musculus). L'utilizzo di un algoritmo sviluppato da Kolaskar A.S. e Tongaonkar P.C. (1990) disponibile attraverso il programma Antigenic Peptide Prediction (www.mifoundation.org) ha permesso di individuare i siti antigenici delle due sequenze.

15 La Richiedente ha quindi individuato le sequenze contenenti un sito antigenico condivise tra uomo e topo e ha rivolto la sua attenzione alle sequenze N-terminali. La scelta della sequenza di un sito antigenico deve preferibilmente cadere sulle regioni N-terminali e C-terminali (a livello della sequenza significa rispettivamente primo ed ultimo aa). Queste regioni sono solitamente accessibili
20 ai solventi e non sono strutturate anche nella forma nativa (non denaturata). Inoltre anticorpi diretti contro queste porzioni riconoscono anche le proteine native. I siti antigenici C-terminali sono stati esclusi per tre considerazioni fondamentali: (a) perché coinvolgono la regione dell'unico dominio funzionale della proteina (U-box) e come tali sono soggetti ad una maggiore conservazione
25 a livello evoluzionistico in altre specie e in altre proteine che, contenendo il



dominio U-box, siano diverse dalla proteina UBE4A/Ufd2b; (b) perché i siti antigenici C-terminali interessanti l'U-box sono siti di legame con il substrato e quindi l'anticorpo il legame con l'anticorpo non permetterebbe il legame del substrato specifico della proteina, rendendo impossibile studi volti a identificare gli interattori di UBE4A; (c) perché trovandosi in un dominio, o in prossimità di esso, sono più soggette ad assumere modificazioni strutturali proprie della proteina che vanno sotto il nome di strutture secondarie e terziarie modificando l'accessibilità dell'epitopo all'anticorpo.

La considerazione espressa al punto (c) è la causa anche dell'esclusione delle regioni centrali della sequenza. Infatti, nel tentativo di identificare proteine in un estratto proteico da tessuto (western blot) è tecnicamente possibile linearizzare, denaturandola, la sequenza amminoacidica della proteina. Questa operazione non è possibile su sezioni di tessuto (immunoistochimica) dove le proteine mantengono la loro struttura nativa o, alternativamente, dove si voglia studiare l'interazione con altre proteine (immunoprecipitazione). Si dà il caso, infatti di anticorpi, pur commercializzati, ma non funzionanti su tessuti, comportando uno svantaggio notevole a livello di applicazioni tecniche. Inoltre la sequenza deve essere specifica di questa proteina, ovvero non presente nelle sequenze altre proteine umane e murine.

Vantaggiosamente, la Richiedente ha selezionato tra un gruppo di sequenze interessanti una sequenza amminoacidica minima scelta nella regione N-terminale secondo i criteri fin qui illustrati. La scelta della sequenza minima garantisce la massima specificità ed efficienza dell'anticorpo per l'antigene e, al contempo, la presenza minima di cross-reazioni ovvero il binding non specifico dell'anticorpo con proteine diverse da UBE4A/Ufd2b.

Una sequenza amminoacidica, oggetto della presente invenzione, è selezionata ed identificata come segue:

Ile-Ser-Ser-Asn-Pro-Phe-Ala-Ala-Leu-Phe-Gly-Ser-Leu-Ala-Asp-Ala-Lys-Gln
(ISSNPFAALFGSLADAKQ). Detta sequenza amminoacidica minima, oggetto
5 dell'invenzione, corrispondente agli amminoacidi 10-27 della sequenza della
proteina UBE4A sia umana che murina.

Chiaramente, la portata della presente invenzione non può essere considerata limitata solo alla sequenza sopra riportata ma, bensì, dovrà essere considerata estesa anche a sequenze da essa derivabili.

10 La sequenza amminoacidica (o peptide) è stata sintetizzata *in vitro* utilizzando metodologie e tecniche note agli esperti del settore.

La sequenza amminoacidica sopra riportata rappresenta l'epitopo della proteina UBE4A/Ufd2b (antigene), per la quale il coniglio ha prodotto l'anticorpo.

È noto che le molecole piccole come i peptidi, sebbene siano capaci di interagire
15 con i prodotti di una risposta immune (come gli anticorpi), possono non essere in grado di stimolarla. In genere, per renderli completamente immunogeni vengono coniugati con una proteina carrier.

Nel presente caso, è stata utilizzata l'albumina di siero bovina (BSA), comunemente utilizzata per la sua stabilità e solubilità nel plasma e per la
20 capacità di impartire immunogenicità del peptide coniugato.

Per la coniugazione del peptide con la BSA è stato utilizzato il kit commerciale "Imject® Immunogen EDC Conjugation kit" della PIERCE (Rockford, IL, US) secondo le istruzioni del produttore.

Ottenuta una soluzione contenente il coniugato peptide-proteina carrier ne
25 abbiamo iniettato 150 µl tramite iniezioni sottocutanee sul dorso del coniglio.

Al 7° giorno dalla prima somministrazione l'operazione è stata ripetuta nello stesso animale per sostenere e aumentare la specificità della risposta immune. L'operazione è stata poi ripetuta ogni 7 giorni per un totale di 6 volte.

La risposta immune è stata monitorizzata a partire dal terzo ciclo di immunizzazione attraverso la tecnica nota dell'ELISA capace di misurare la risposta anticorpale sul siero del coniglio. Il siero del coniglio è stato ottenuto tramite il prelievo di 5ml di sangue dalla vena auricolare dell'animale. Come "bianco" per il test ELISA è stato utilizzato il siero del coniglio prelevato antecedentemente alla prima immunizzazione (siero preimmune).

L'anticorpo policlonale individuato dopo i sei cicli di immunizzazione ha consentito di poter studiare i profili di espressione della proteina UBE4A su una serie di tessuti sia umani che murini.

Lo studio dell'espressione su lisati contenenti estratti proteici da tessuti umani e murini ci ha permesso analizzare l'espressione della proteina sia qualitativamente che quantitativamente. Tramite la tecnica nota del Western Blotting l'anticorpo policlonale è infatti capace di riconoscere la proteina UBE4A/Ufd2b come una unica banda di circa 125kDa (figura 1) e 130kDa rispettivamente nell'uomo e nel topo. Questo dato indica da un lato che l'anticorpo non mostra cross-reazioni con altre proteine ed è quindi altamente specifico e dall'altro che la proteina non presenta isoforme o modificazioni post-trascrizionali evidenti poiché il peso molecolare corrisponde approssimativamente a quello ottenuto dalla somma del peso molecolare dei singoli amminoacidi.

Successivamente, la Richiedente ha testato l'efficienza dell'anticorpo su sezioni di tessuto umano attraverso la tecnica nota chiamata immunoistochimica. L'immunoistochimica determina la presenza di un antigene in tessuti sani o

patologici. Molti anticorpi “lavorano” molto bene con altri metodi ma possono essere totalmente inefficaci su tessuto.

Ad esempio nel caso del cervello è stata utilizzata una sezione di 5 µm tessuto in paraffina poi montata su vetrino a carica positiva. Successivamente la sezione è stata deparaffinizzata e trattata con xylene e alcol. Poi le sezioni sono state trattate con l'anticorpo policlonale anti-UBE4A, oggetto dell'invenzione, (anticorpo primario) con una diluizione di 1:2000 per -1 ora a temperatura ambiente. Successivamente sono stati eseguiti dei lavaggi per eliminare l'eccesso di anticorpo e le sezioni vengono incubate con siero anti-IgG del coniglio biotinilato (anticorpo secondario) e poi con per ossidasi legata a streptavidina. La colorazione è stata completata incubando le sezioni con una soluzione di cromogeno. A questo punto dopo aver eseguito un lavaggio è stato utilizzato il colorante ematossilina per dare contrasto alle strutture cellulari. La sezione è stata quindi coperta con un coprivetrino e analizzata al microscopio ottico (figura 2).

L'immunoistochimica di sezioni di cervello ha permesso di localizzarlo nel nucleo e nel citoplasma dei neuroni corticali e degli oligodendrociti dove l'ubiquitinazione gioca un ruolo fondamentale nella regolazione degli switch differenziativi.

Al contrario l'immunoistochimica condotta su sezioni in paraffina di tubulo renale ha evidenziato una espressione prettamente citoplasmatica.

Lo staining su sezioni di fegato ha mostrato un pattern diffusamente citoplasmatico e una particolare espressione nucleare: infatti gli epatociti sono risultati su una stessa sezione positivi, debolmente positivi o negativi all'immunoistochimica suggerendo che UBE4A/Ufd2b abbia un espressione



dipendente dal ciclo cellulare o giochi un ruolo nel controllo del ciclo cellulare stesso. Inoltre la presenza di staining citoplasmatico in neuroni ed epatociti indica che UBE4A/Ufd2b contribuisce alla degradazione di specifici substrati integrali alla funzione epatiche e neuronale (figura 2).

5 UBE4A/Ufd2b è inoltre uno dei pochi geni che mappano nei 2-5 cM della regione 11q che risulta frequentemente deleta in casi di Neuroblastoma senza amplificazione di N-Myc e con prognosi infausta.

Krona et al.; hanno di recente riportato che l'omologo umano di UBE4A, che è UBE4B che mappa sul cromosoma 1p36 risulta deleto in tutti i casi della loro
10 casistica di NBL di stadio 3 e mutato in un caso di NBL.

Inoltre riarrangiamenti della regione 11q23 sono presenti in molti casi di Leucemia acuta Linfoide e Leucemia Acuta Mieloide. Sebbene in queste leucemie le traslocazioni a carico del cromosoma 11 interessino principalmente il gene MLL che mappa vicino a UBE4A/Ufd2b, in letteratura sono descritti
15 casi in la traslocazione 11q23 coinvolge altri geni non identificati ma diversi da MLL.

L'anticorpo della presente invenzione ha inoltre permesso di evidenziare una disregolazione dell'espressione di UBE4A/Ufd2b in un set di tessuti umani neoplastici tramite immunoistochimica. UBE4A/Ufd2b è up-regolato a livello
20 della reazione desmoplastica, ovvero la reazione produttiva alla neoplasia che si estrinseca con la genesi di uno stroma per la neoplasia epiteliale.

La figura 1 mostra l'espressione di UBE4A/Ufd2b attraverso Western Blotting. L'analisi su estratti di proteine da tessuti umani mostra la proteina UBE4A/Ufd2b identificata dall'anticorpo policlonale anti-UBE4A come una singola
25 banda di circa 125 kDa. UBE4A/Ufd2b è espressa ad alti livelli nel muscolo

scheletrico, rene e fegato e debolmente nei leucociti da sangue periferico e nella milza.

La figura mostra uno studio dell'espressione tramite immunoistochimica della proteina UBE4A/Ufd2b umana nel cervello (A, B), cuore (C, D), rene (E, F),
5 fegato (G, H) e polmone (I, J). Le sezioni di tessuto umano sono state colorate a sinistra con ematossilina-eosina (A, C, E, G and I) e a destra con l'anticorpo policlonale per la proteina UBE4A/Ufd2b (B, D, F, H, and J). La specificità della reazione immunoistochimica è stata validata tramite il confronto con
sezioni colorate con il siero preimmune del coniglio alla stessa diluizione
10 dell'anticorpo primario (dati non mostrati). La positività della colorazione con l'anticorpo policlonale anti-UBE4A nel nucleo è indicata dalle frecce "triangolo vuoto", nel citoplasma dalle frecce "triangolo pieno scuro". Come mostrato, UBE4A/Ufd2b è espresso soprattutto nel nucleo e nel citoplasma di neuroni corticali (B; n) e oligodendrociti (B; o) e nel nucleo di cellule del tubulo renale
15 (F). Nel fegato UBE4A/Ufd2b ha mostrato una espressione nucleare e una debole espressione citoplasmatica (H) nella maggiorparte degli epatociti. L'espressione di UBE4A/Ufd2b non è stata rilevata a livello del cuore e del polmone (D and J).

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo policlonale anti-UBE4A/Ufd2b.
2. Anticorpo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto di essere selettivo per l'antigene proteina UBE4A umana e murina nella porzione relativa alla sequenza dell'epitopo in posizione 10-27.
3. Anticorpo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che detta sequenza, corrispondente agli amminoacidi 10-27 nella sequenza della proteina UBE4A sia umana che murina, è rappresentata come segue: Ile-Ser-Ser-Asn-Pro-Phe-Ala-Ala-Leu-Phe-Gly-Ser-Leu-Ala-Asp-Ala-Lys-Gln.
4. Anticorpo secondo la rivendicazione 3, caratterizzato dal fatto di essere coniugato con una proteina carrier come l'albumina di siero bovina (BSA),
5. Metodo immunoistochimico per determinare l'antigene proteina UBE4A/Ufd2b comprendente l'impiego dell'anticorpo secondo una o più delle rivendicazioni 1-4.
6. Metodo diagnostico e prognostico per determinare la presenza di alterazioni molecolari nella regione 11q23 caratterizzato dal fatto di comprendere una fase nella quale l'anticorpo secondo una o più delle rivendicazioni 1-4 reagisce selettivamente con l'antigene proteina UBE4A/Ufd2b.
7. Metodo secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che dette alterazioni molecolari sono provocate da forme tumorali: Neuroblastoma, Leucemia Acuta Linfoide e Leucemia Acuta Mieloide.
8. Metodo per evidenziare una disregolazione dell'espressione di UBE4A/Ufd2b in campioni di tessuti umani neoplastici e affetti da eventi neurodegenerativi tramite immunoistochimica.
9. Kit diagnostico e prognostico come marcatore delle alterazioni della regione

11q23 caratterizzato dal fatto di comprendere l'anticorpo secondo una o più
delle rivendicazioni precedenti.

p.i. della UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA" e

ISTITUTI FISIOTERAPICI OSPITALIERI

5

IL MANDATARIO

Dott. Roberto Margutti

Albo Prot. n. 938

Roberto Margutti



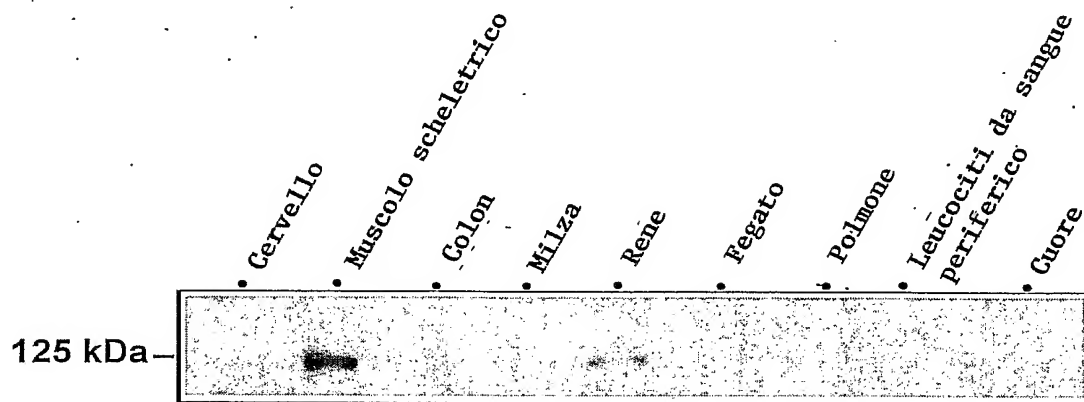


FIG. 1

MI 2004 A0 00251

P.I. DEI TITOLARI

TAV. 1 / 2

IL MANDATARIO

Dott. Roberto Margutti
iscritto all'Albo con il n. 938B



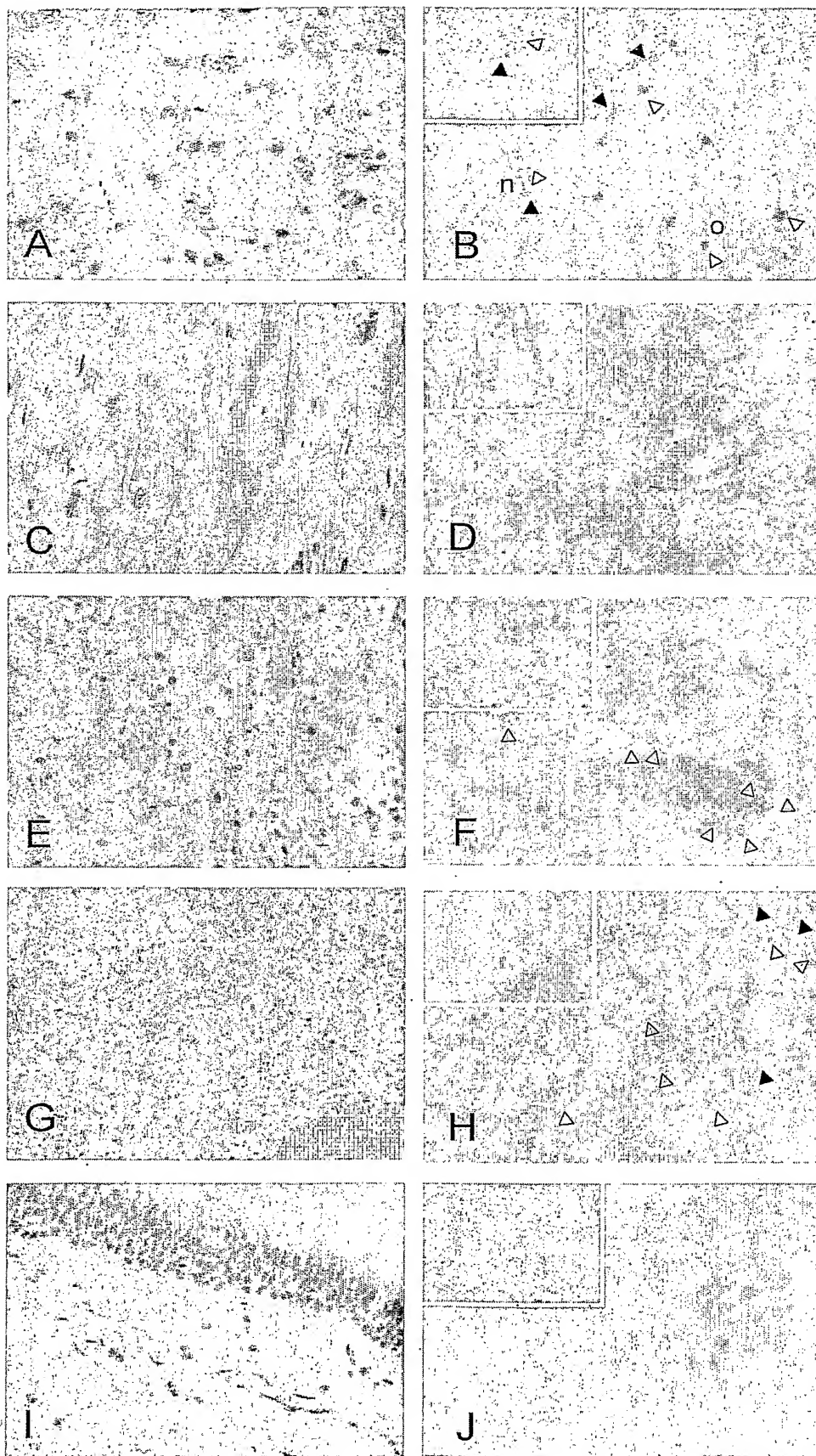


FIG. 2

P.I. DEI TITOLARI

TAV. 2/2

IL MANDATARIO

Dott. Roberto Vergutti

Iscritto all'Albo dei C.N.M.I. n. 938B

MI 2004 A 0 0 0 2 5 1

